

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



**Aplicação da análise da composição isotópica no  
esclarecimento da origem das presas consumidas  
pela lontra numa área de pisciculturas**

Élia Pires Marques

Mestrado em Biologia da Conservação

2011

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



# **Aplicação da análise da composição isotópica no esclarecimento da origem das presas consumidas pela lontra numa área de pisciculturas**

Élia Pires Marques

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação orientada por:

Prof. Doutora Cristina Máguas (DBV/SIIAF)

Prof. Doutora Margarida Santos-Reis (DBA/CBA)

2011

*It's not always easy getting on with your neighbours –  
particularly when they're wild animals...*

*World Wildlife Fund*

## **Índice**

<i>Agradecimentos</i> .....	i
<i>Resumo</i> .....	iii
<i>Abstract</i> .....	v
<i>1. Introdução</i> .....	1
<i>2. Material e Métodos</i> .....	7
2.1 Área de estudo.....	7
2.2 Recolha e Preparação das Amostras .....	8
2.3 Análise da composição isotópica de C e N em colagénio do osso dos peixes...	9
2.4 Avaliação da eficácia das equações de normalização .....	11
2.5 Comparação das composições isotópicas de C e N no colagénio do osso em peixes de estuário e de piscicultura .....	12
2.6 Avaliação do consumo de douradas e linguados predados nas pisciculturas vs. predados no estuário.....	12
<i>3. Resultados</i> .....	13
3.1 Avaliação da eficácia das equações de normalização .....	13
3.2 Dejetos .....	14
3.4 Avaliação do consumo de douradas e linguados predados nas pisciculturas vs. predados no estuário.....	18
<i>4. Discussão</i> .....	19
4.1 Comparação das composições isotópicas de C e N no colagénio do osso em peixes de estuário e de piscicultura .....	19
4.2 Avaliação do consumo de douradas e linguados predados na piscicultura vs. predados no estuário.....	20
4.3 Avaliação da eficácia das equações de normalização .....	22
4.4 Dejetos .....	23
4.5 Considerações finais .....	23
<i>5. Bibliografia</i> .....	25

## ***Índice de Figuras***

Figura 1 – Estuário do Sado: pisciculturas avaliadas por Freitas *et al.* em 2007 (polígono preto). Realce para a piscicultura Anjo (indicada pela seta) ..... 9

Figura 2 – Relações entre  $\delta^{13}\text{C}$  observado e  $\delta^{13}\text{C}$  esperado para as douradas (a.) e para os linguados (b.) com base nas equações de McConnaughey e McRoy (1979) (círculo), Kiljunen *et al.* (2006) (quadrado) e Post *et al.* (2007) (triângulo). A reta  $y = x$  está representada pela linha sólida ..... 15

Figura 3 – Variação de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  em dourada (a.) e linguado (b.) alimentados a ração (círculo) e não alimentados a ração (quadrado) e nas peças esqueléticas encontradas nos dejetos (triângulo) ..... 17

## ***Índice de Tabelas***

Tabela 1 – Número de amostras ( <i>n</i> ), razões médias C:N antes e após a extração dos lípidos ( <i>C:N</i> e <i>C:N<sub>ext</sub></i> , respetivamente) e valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ antes e após a extração de lípidos e depois de corrigidos matematicamente segundo McConnaughey e McRoy, Kiljunen <i>et al.</i> e Post <i>et al.</i> ( $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{13}\text{C}_{\text{ext}}$ , $\delta^{13}\text{C}_{\text{extMM}}$ , $\delta^{13}\text{C}_{\text{extK}}$ , $\delta^{13}\text{C}_{\text{extP}}$ , respetivamente) para as amostras de <i>Sparus aurata</i> e <i>Solea spp.</i> consideradas.....	13
Tabela 2 – Avaliação da eficiência (EF) de cada um dos modelos considerados – McConnaughey e McRoy, Kiljunen <i>et al.</i> e Post <i>et al.</i> – para douradas e linguados .....	14
Tabela 3 – Número mínimo de peixes com interesse comercial por dejetos .....	16
Tabela 4 - Assinaturas isotópicas médias (Med), desvio-padrão (DP), mínimo (Min) e máximo (Max) de <i>Sparus aurata</i> e <i>Solea spp.</i> provenientes das águas livres do estuário (Est) e da piscicultura (Pis).....	18

## ***Agradecimentos***

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que permitiram que este trabalho fosse possível e que, de uma forma ou de outra, para ele contribuíram.

Agradeço em particular:

Às minhas orientadoras Prof. Dra. Cristina Máguas e Prof. Dra. Margarida Santos-Reis por toda a dedicação, interesse e disponibilidade que demonstraram ao longo do trabalho. A ambas agradeço também toda a ajuda e sugestões, quer para a solução dos pequenos problemas que naturalmente foram surgindo, quer para a conclusão da dissertação.

À Dália Freitas, minha companheira no trabalho de campo, pelo contato estabelecido com o pescador e o piscicultor, pela boa disposição que tornou todo o trabalho mais fácil e divertido, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela ajuda dada nas identificações das espécies de peixe, e pelo interesse que sempre demonstrou ao longo do trabalho. Agradeço em especial pela amizade e disponibilidade sempre presentes.

Ao Rodrigo Maia, meu companheiro no trabalho de laboratório, por toda a dedicação e paciência na transmissão de conhecimentos, pelo auxílio prestado nas análises laboratoriais e pelo interesse que sempre demonstrou ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique Cabral pela ajuda, disponibilidade e paciência aquando no esclarecimento de dúvidas acerca de análises estatísticas.

À Tatá pelo auxílio, disponibilidade e paciência para a elaboração do mapa do estuário.

Ao Sr. Américo, dono da piscicultura Anjo, pela permissão de realizar a coleta de dejetos de lontra no perímetro dos seus tanques e pelos peixes cedidos para análise da composição isotópica. Agradeço em especial, a sua simpatia, disponibilidade e confiança.

Ao Sr. Valdemar, pescador no Estuário do Sado, por todo o apoio que sempre manifestou, e pelos peixes cedidos para análise da composição isotópica.

À Vanessa Gil e à Fabiana Marques pela amizade e companhia em algumas saídas de campo.

Ao Francisco Moreira, à Marta Acácio e à Raquel Mendes pela sua amizade e companhia nas horas de laboratório e de almoço, e pelas importantes sugestões e contribuições para o trabalho.

À minha mãe e ao meu pai, porque tudo o que consegui devo-o a eles sendo, assim, deles também.



## **Resumo**

A forma exposta de produção que se verifica em muitas pisciculturas propicia conflitos entre esta atividade e a conservação de vertebrados piscívoros residentes na região. Dentro da Reserva Natural do Estuário do Sado a produção piscícola é uma das atividades permitidas e a lontra é acusada de causar prejuízos uma vez que, alegadamente parte do peixe que consome é retirado dos tanques de produção. Para tentar compreender a origem das presas de interesse comercial – dourada e linguado – que este carnívoro consome recorreu-se à análise das composições isotópicas de C e N do colagénio dos ossos de peixes provenientes do estuário, dos tanques de produção de uma piscicultura selecionada, e dos dejetos recolhidos ao longo do perímetro dos mesmos tanques. Testou-se a eficácia de três modelos na correção dos efeitos dos lípidos nas assinaturas de carbono sendo que nenhum se mostrou eficiente. Foi feita portanto, a extração deste componente bioquímico em todas as amostras analisadas. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  apresentaram diferenças significativas que permitiram distinguir tanto as douradas como os linguados de estuário e da piscicultura. Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  permitiram apenas distinguir a origem das douradas, já que não se verificaram diferenças significativas entre os linguados de estuário e da piscicultura. As peças esqueléticas de douradas encontradas nos dejetos parecem indicar que todas são provenientes do estuário, pois apresentam valores de  $\delta^{15}\text{N}$  semelhantes aos das douradas aí capturadas. Apesar de estes dois grupos possuírem valores de  $\delta^{13}\text{C}$  distintos, ainda que da mesma ordem de grandeza, as diferenças observadas poderão reflectir as características dos diferentes locais de origem das amostras utilizadas: dejectos de lontra refletem consumo de presas em águas menos profundas na margem do estuário, enquanto os peixes capturados pelo pescador tiveram origem em águas mais profundas. Quanto aos linguados, os dados obtidos não são esclarecedores muito provavelmente devido à diminuta amostra de animais consumidos pela lontra. Ainda assim, globalmente parece existir uma preferência das lontras pelo estuário em detrimento da piscicultura. Os resultados deste estudo são reveladores do elevado potencial da análise isotópica no esclarecimento da pressão predatória exercida pela lontra em pisciculturas do estuário do Sado e, apesar do carácter preliminar dos dados,

contribuem para uma melhor compreensão da problemática da conservação da lontra naquela área protegida.

**Palavras-chave:** *Lutra lutra*, dieta, assinaturas isotópicas, pisciculturas, Reserva Natural do Estuário do Sado, conservação

## ***Abstract***

The exposed form of production used in several fish farms is prone to conflicts between this activity and the conservation of resident piscivorous vertebrates. Fish production is one of the activities that is allowed inside the Sado Estuary Natural Reserve and otters are accused of losses since, allegedly part of the fish consumed is removed from the production tanks. To try to understand the origin of the preys with commercial interest – gilt-head bream and sole - that this carnivore consumes the analysis of isotopic compositions of C and N of bone collagen was used with fish from the estuary, from the production tanks of a selected fish farm and from scats collected along the perimeter of the same tanks. The effectiveness of three models in correcting the effects of lipids in carbon signatures was tested but none proved to be effective. Therefore, the extraction of this biochemical component was carried out in all samples analyzed.

The  $\delta^{15}\text{N}$  values showed significant differences that allow to distinguish both gilt-head breams and soles of estuary from the ones of fish farms. The values of  $\delta^{13}\text{C}$  only allowed to distinguish the origin of gilt-head bream, since there weren't significant differences between soles from estuary and from fish farms. The skeletal parts of gilt-head breams found in the scats seem to indicate that all are from the estuary, because they have  $\delta^{15}\text{N}$  values similar to those of the gilt-head bream fished there. Although these two groups have different  $\delta^{13}\text{C}$  values, even in the same order of magnitude, they may be reflecting the characteristics of the different locals of origin of the samples used: otter scats reflect the consume of preys in less deep waters at the margin of the estuary, while the fishes captured by the fisherman had origin in deeper waters. To the soles, the obtained data are not elucidative probably because of the small sample of animals consumed by otters. Still, overall there seems to be a preference of otters for the estuary in the detriment of the fish farm. The results of this study reveal the high potencial of isotopic analyses to clarify the predatory pressure exerted by otters in fish farms of Sado estuary and, although these data are preliminary, they contribute to a better comprehension of the problem of otter conservation in that protected area.

**Keywords:** *Lutra lutra*, diet, isotopic signatures, fish farms, Sado's Estuary Natural Reserve, conservation

## 1. Introdução

Conflitos entre o Homem e animais selvagens, com origem no uso comum de recursos alimentares e/ou de espaço, são uma das maiores ameaças à sobrevivência de várias espécies em diferentes regiões do globo. Esta situação decorre principalmente do rápido crescimento da população humana e da conversão de *habitats* naturais, e os seus impactos podem ser muito significativos. Por um lado, as populações podem perder plantações, gado, peixe e, por vezes, até vidas humanas. Na tentativa prevenir prejuízos futuros, os animais são muitas vezes abatidos intencionalmente, capturados através de armadilhas ou envenenados (WWF International 2006).

Atualmente estão descritas várias situações de interação entre espécies ameaçadas ou em perigo e a exploração de recursos biológicos pelo Homem, as quais abrangem espécies muito distintas e diversas atividades económicas (Zhang e Wang 2003, Patterson *et al.* 2004, Yeo e Neo 2010). Entre elas estão os conflitos em zonas onde a produção de peixe em pisciculturas se cruza com a presença de vertebrados piscívoros (Freitas *et al.* 2007, Morrison e Vogel 2009, Sales-Luís *et al.* 2009). A produção a céu aberto que se verifica nestes locais é propícia à predação por animais selvagens, como a lontra euro-asiática *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758), para a qual o peixe é a presa mais importante, por vezes constituindo mais de 80% do total dieta (Ruiz-Olmo *et al.* 2008). Este mustelídeo apresenta uma distribuição bastante ampla em Portugal, incluindo as zonas estuarinas, um dos habitats a que normalmente está associado e onde, ao mesmo tempo, se concentram grande parte das pisciculturas nacionais. Esta situação conduziu diretamente a um cenário de conflito entre a conservação da lontra e a atividade de produção de peixe em pisciculturas (Freitas *et al.* 2007, Ruiz-Olmo *et al.* 2008). Além disso, as áreas estuarinas fazem parte da Rede Nacional de Áreas Protegidas devido ao seu elevado valor ecológico (ICNB 2007), o que condiciona a atividade piscícola estabelecida nestas zonas através da imposição de medidas restritivas. Como se tal não bastasse, numa tentativa de recuperar os *stocks* de peixe no mar, drasticamente reduzidos nas últimas décadas devido à pesca

intensiva, a União Europeia encorajou financeiramente o desenvolvimento de pisciculturas (Freitas *et al.* 2007).

Num inquérito realizado pelo ICN a nível nacional, os piscicultores da Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES) apontaram a lontra como sendo um visitante frequente nos seus tanques e alguns consideraram-na uma peste. Os prejuízos causados por este predador foram tidos como sendo bastante significativos, apesar de não estarem quantificados (Trindade 1991).

A lontra euro-asiática está listada no Livro Vermelho dos Vertebrados Terrestres de Portugal na categoria 'Pouco Preocupante' (LC) (Cabral *et al.* 2005). No entanto, na Europa, a espécie continua a ser matéria de preocupação e a categoria de ameaça atribuída pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) tem vindo a piorar estando classificada como 'Quase Ameaçada' (NT) desde 2004 (ICNB 2007). A perseguição direta por parte do Homem devido à concorrência pelo peixe é um dos fatores de ameaça mais importantes para as populações de lontra. Atualmente, a espécie está protegida por legislação e convenções internacionais. Está listada no Apêndice I do CITES, Apêndice II da Convenção de Berna, Anexos II e IV das Diretivas dos Habitats e das Espécies da União Europeia e no Apêndice I da Convenção de Bona. Além disso, alguns programas de monitorização foram já estabelecidos em vários países europeus (Ruiz-Olmo *et al.* 2008).

No âmbito de um projeto europeu *Framework for Biodiversity Reconciliation Action Plans* (FRAP) com vista à reconciliação entre a conservação de grandes vertebrados e o uso de recursos biológicos pelo Homem foi analisada a dieta da lontra a partir de dejetos recolhidos no perímetro dos tanques de várias pisciculturas localizadas dentro da RNES. Esta análise permitiu verificar que, em termos de percentagem de biomassa, os grupos mais consumidos por este predador eram os linguados (*Solea solea* Linnaeus, 1758 e *Solea senegalensis* Kaup, 1858) (44,53%) e as douradas (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) (14,14%) (Freitas *et al.* 2007), ambos objeto de produção em várias pisciculturas da região, mas igualmente presentes, ainda que em menor abundância e tamanho, no ambiente estuarino (Freitas *et al.* 2007). Hoje em dia, como resultado dos elevados prejuízos percepcionados pelos piscicultores e da

proibição do uso da maioria das medidas de mitigação dos prejuízos, constata-se uma grande aversão em relação à lontra, o que poderá contribuir para a sua caça ilegal com consequências diretas no efetivo populacional local e na conservação da espécie. No entanto, observaram-se diferenças entre a predação percebida pelos piscicultores e a predação estimada (Freitas *et al.* 2007). Estando ainda por determinar a proveniência dos indivíduos consumidos por este predador, uma vez que estes tanto podem ter sido predados nas pisciculturas como nas águas livres do estuário, não é possível contudo avaliar o real prejuízo dos piscicultores através dos métodos tradicionais utilizados nos estudos da dieta. É neste contexto que se torna necessário recorrer a metodologias alternativas com potencial para contribuir para uma avaliação mais rigorosa do impacto da predação.

Desde estimativas do momento em que um animal mudou os seus hábitos alimentares devido ao desmame (Drupas *et al.* 2001, Newsome *et al.* 2006) ao seguimento das rotas de migração de aves (Keith *et al.* 2001) e morcegos (Cryan *et al.* 2004), a estudos das influências do decréscimo de salmão na dinâmica do azoto nos ecossistemas terrestres (Bartz e Naiman 2005), ou à reconstrução do clima a partir dos anéis de crescimento das árvores (Loader *et al.* 2003), a análise da composição isotópica tem-se revelado uma ferramenta com elevada aplicação em estudos de ecologia.

Os isótopos são definidos como uma de duas ou mais formas de um elemento, que têm o mesmo número de protões no núcleo mas diferentes números de neutrões, o que resulta em diferentes números de massa (soma do número de protões e neutrões). Os isótopos estáveis não decaem com o passar do tempo, ao contrário dos isótopos radioativos. Por causa das diferentes massas, estes isótopos comportam-se de maneira diferente em diversos processos fisiológicos e ambientais. Este processo, conhecido por fraccionamento isotópico, leva a que existam variações naturais nas razões isotópicas. Estas variações podem ser analisadas em diferentes amostras biológicas usando um espectrofotómetro de massas de razão isotópica de fluxo contínuo (Brenna *et al.* 1997).

A análise da composição isotópica tem sido amplamente usada em estudos de dieta, uma vez que os tecidos do consumidor são sintetizados a partir dos nutrientes

que esta contém, e vão desta forma refletir a sua composição isotópica (McKechnie 2004, West *et al.* 2006, Crawford *et al.* 2008). Por exemplo, o urso pardo *Ursus arctos* que se alimenta de salmão *Salmo salar* possui valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  muito diferentes dos dos animais da mesma espécie que se alimentam de bagas (Ben-David *et al.* 2004). Da mesma maneira, diferenças nas assinaturas isotópicas de carbono e azoto foram usadas para distinguir salmónídeos selvagens dos criados em pisciculturas, uma vez que os dois grupos têm dietas distintas (Dempson e Power 2004, Schroder e Leaniz 2011).

As composições isotópicas de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e azoto ( $\delta^{15}\text{N}$ ) têm sido bastante utilizadas em estudos de dieta (Drupas *et al.* 2001, Ben-David *et al.* 2004, Newsome *et al.* 2006, Schroder e Leaniz 2011). Em sistemas terrestres, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  estão sobretudo dependentes do metabolismo fotossintético das plantas, uma vez que as plantas  $\text{C}_3$  são empobrecidas em  $\delta^{13}\text{C}$  em relação às plantas  $\text{C}_4$  e CAM (Ehleringer 1991, Lajtha e Michener 1994). Esta diferença, que normalmente está entre 12 a 14‰, é utilizada para estudar a importância de plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  e CAM na dieta de diferentes espécies animais (Codron *et al.* 2006). As análises de  $\delta^{13}\text{C}$  podem ainda ser usadas para distinguir recursos marinhos de recursos terrestres, pois apesar de o fitoplâncton ter uma fotossíntese do tipo  $\text{C}_3$ , utiliza sobretudo bicarbonato como fonte de carbono e não o  $\text{CO}_2$  atmosférico apresentando, assim, valores de  $\delta^{13}\text{C}$  mais elevados (Roth 2002). A  $\delta^{15}\text{N}$  também é mais elevada em sistemas marinhos do que terrestres o que pode ajudar perceber a importância de recursos marinhos nos ecossistemas terrestres (Ben-David *et al.* 2004). Além disso, é frequentemente utilizada para estimar o nível trófico de indivíduos, já que existe aumento previsível do seu valor, normalmente entre os 2,2‰ e os 3,4 ‰, à medida que se sobe de um nível trófico para o seguinte (Minagawa e Wada 1984, Post 2002, Fry 2006). A  $\delta^{15}\text{N}$  também já foi usada, por exemplo, para estimar a idade do desmame em duas espécies da família Otariidae (*Callorhinus ursinus* e *Zalophus californianus*) considerando que nessa altura se dá um enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  detetado no colagénio do osso das crias (Newsome *et al.* 2006). O colagénio do osso é proteico e, por isso, produzido a partir da porção proteica dos alimentos ingeridos, sendo que a análise da sua composição isotópica permite inferir diferentes aspetos da dieta ao longo de vários anos (Tykot 2004).



Sendo a lontra um animal territorial, marca regularmente os mesmos locais, normalmente pontos elevados, com fezes onde se distinguem muitas vezes diferentes partes esqueléticas dos peixes consumidos (Carnivora 2011). A análise da composição isotópica do colagénio destas estruturas poderá revelar-se uma metodologia alternativa bastante eficaz para perceber a origem das presas das lontras que frequentam as pisciculturas, uma vez que os peixes criados nestas estruturas, nomeadamente douradas e linguados têm uma alimentação distinta da dos peixes do estuário. Aos primeiros é oferecido um suplemento de ração à base de farinha de peixe e bagaço e farinha de soja, enquanto as douradas e linguados de estuário se alimentam sobretudo de gastrópodes e bivalves (Pita *et al.* 2002) e de poliquetas e pequenos crustáceos (Cabral 2000), respetivamente.

Como método para estudos de dieta, a utilização de das composições isotópicas tem revelado inúmeras vantagens sobre os métodos tradicionais (McKechnie 2004, West *et al.* 2006, Crawford *et al.* 2008). Uma vez que as taxas de regeneração dos diversos tecidos são diferentes, com um único momento de amostragem, no qual estes tecidos são recolhidos, é possível obter várias fontes de informação. Por exemplo, a composição isotópica do pelo informam-nos acerca da dieta recente de um animal (Cerling *et al.* 2006), enquanto o colagénio do osso pode armazenar informação ao longo de vários anos (Tykot 2006). Assim, os resultados que se obtêm a partir das análises das composições isotópicas despendem muito menos tempo para serem desvendados do que se fossem utilizados os métodos tradicionais. Além disso, conhecendo a fenologia do crescimento, podem solucionar-se questões acerca da dieta em determinados períodos (por exemplo, durante meses em que os mamíferos se deslocam para locais de difícil acesso aos humanos, ou cujo alcance implicaria custos muito elevados), que de outra forma poderiam permanecer inexplicadas.

Apesar das vantagens acima apontadas, a presença de lípidos nos tecidos levanta alguns problemas. Quando comparados com as proteínas, os lípidos apresentam um valor de  $\delta^{13}\text{C}$  mais reduzido (Sweeting *et al.* 2006), além disso quanto maior a quantidade de lípidos presentes num tecido maior é a variação no valor de

$\delta^{13}\text{C}$  (Kiljunen *et al.* 2006). Para corrigir esta variação pode proceder-se à extração dos lípidos das amostras, uma vez que após a extração os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  obtidos refletem mais corretamente o carbono assimilado, enquanto os valores sem correção resultam de efeitos combinados da assimilação e síntese dos lípidos. Contudo, esta abordagem apresenta várias desvantagens, pois requer amostras maiores e aumenta o tempo e os custos necessários. Adicionalmente, se estivermos também interessados nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , teremos de os determinar antes da extração de lípidos. Com este passo pretende-se obter valores mais exatos, uma vez que estes seriam afetados pela extração. Vemos assim duplicar os custos da análise isotópica. No entanto, McConnaughey e McRoy 1979; Kiljunen *et al.* 2006; Post *et al.* 2007 estudaram já relações entre o conteúdo lipídico dos tecidos, as razões C:N, e a variação de  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ) e identificaram equações de normalização (McConnaughey e McRoy 1979, Kiljunen *et al.* 2006 e Post *et al.* 2007) que pretendem evitar os gastos de tempo e de dinheiro que a extração dos lípidos comporta.

Assim, os objetivos deste estudo são, recorrendo a análises de composição isotópica do carbono e do azoto do colagénio do osso de douradas e linguados: 1) avaliar a eficácia das equações de normalização estabelecidas por McConnaughey e McRoy 1979, Kiljunen *et al.* 2006 e Post *et al.* 2007 para *Solea spp.* e *Sparus aurata*, 2) verificar se a análise da composição isotópica do carbono e do azoto do colagénio do osso das douradas e dos linguados permite identificar a sua proveniência – águas livres do estuário ou piscicultura seleccionada para este estudo e 3) determinar a origem geográfica das peças esqueléticas das espécies em estudo, encontradas nos dejetos de lontras que utilizam a zona das pisciculturas.

Com base nos resultados desta primeira abordagem pretende-se avaliar o potencial da análise isotópica para o esclarecimento do impacto da predação por lontra nas pisciculturas e contribuir para a resolução do conflito Homem – lontra na RNES. Este tipo de informação é de extrema importância para a gestão de recursos, a resolução dos conflitos e a conservação da espécie, pois permite uma aplicação mais adequada de medidas de mitigação, compensação e proteção.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Área de estudo**

Este estudo foi realizado na Reserva Natural do Estuário do Sado que se localiza a SE de Lisboa a cerca de 50 km.

Uma área relativamente grande deste estuário está ocupada para produção piscícola, de sal e agricultura intensiva. Outras atividades económicas aí presentes incluem a silvicultura, a pesca profissional, a indústria do papel e a indústria química. Ainda assim, a maior parte do estuário foi classificado como Reserva Natural devido à presença de elevados níveis de biodiversidade e é também um sítio *Natura 2000*. Aqui encontramos uma fauna bem representada com 261 espécies de vertebrados – 8 anfíbios, 11 répteis, 211 aves e 31 mamíferos – entre os quais uma grande variedade de vertebrados piscívoros. Em conjunto com o Paul do Boquilobo, é considerada uma área prioritária para a conservação da lontra em termos nacionais (Trindade *et al.* 1995). Na zona estuarina do Sado estão já identificadas 44 espécies de peixes e vários moluscos, com grande interesse comercial e biológico. Os objetivos da RNES passam pela manutenção da biodiversidade do estuário, pelo desenvolvimento de atividades compatíveis com o equilíbrio deste ecossistema e a correta exploração dos recursos, entre outros (ICNB 2007).

As pisciculturas do estuário do Sado produzem quatro espécies marinhas – dourada *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, robalo *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), linguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858 e solha *Solea solea* (Linnaeus, 1758). Na piscicultura escolhida para este estudo, à exceção do robalo, todas as espécies são produzidas. Devido ao estatuto de proteção do estuário, esta atividade está condicionada no uso dos terrenos e algumas práticas de gestão são reforçadas com o objetivo de preservar a vocação natural do estuário. Por, exemplo, é proibida a vedação dos tanques como tentativa de prevenir possíveis prejuízos causados pela lontra. É assim previsível a existência de conflitos entre a conservação da lontra e a atividade piscícola.

Dentro da reserva, para esta primeira abordagem seleccionou-se uma piscicultura (Anjo) com base na: 1) disponibilidade do piscicultor para cooperar no estudo, 2) elevada percepção de predação por parte do piscicultor (Freitas *et al.* 2007) 3) regularidade da presença de lontra (45% de taxa de visitação diária pela lontra - Freitas *et al.* 2007) e 4) evidência do consumo de indivíduos das espécies aí produzidas (49% - Freitas *et al.* 2007). Em termos da regularidade da presença de lontra a piscicultura Anjo é, no conjunto de 14 pisciculturas analisadas, a segunda menos visitada e ainda assim o piscicultor tem uma percepção elevada do impacto da predação. Torna-se, assim, interessante tentar perceber se o conflito observado tem uma base ecológica, esclarecendo se o predador está realmente a alimentar-se dos peixes criados dentro da piscicultura.

## 2.2 Recolha e Preparação das Amostras

A recolha de amostras foi realizada entre abril e junho de 2005, no caso dos dejetos de lontra (D Freitas, com. pess.), e entre março e agosto de 2011, no caso dos peixes.

Os dejetos de lontra foram recolhidos em transetos realizados ao longo dos perímetros dos tanques da piscicultura e colocados em sacos individuais até serem analisados. No laboratório foram lavados em água corrente utilizando-se, para tal, um coador de malha fina (0,8mm). Os ossos identificáveis foram separados do restante material e mais uma vez lavados em água corrente. A identificação foi feita usando uma coleção de referência elaborada a partir de espécies de peixes que ocorrem na área de estudo. Separaram-se os ossos de *Sparus aurata* e *Solea sp.* e determinou-se o número mínimo de indivíduos consumido através da combinação de estruturas ósseas pares diagnosticantes. Para uma descrição detalhada dos métodos de campo e de laboratório ver Freitas *et al.* 2007.

Para a análise isotópica dos peixes recolheram-se três espécimes de *Sparus aurata* e três espécimes de *Solea spp.* (dois espécimes de *Solea senegalensis* e um de *Solea solea*), alimentados a ração, na piscicultura escolhida previamente para este estudo (**Figura 1**) por o proprietário ter mantido a mesma ração usada no momento de recolha dos dejetos de lontra seis anos antes. Só assim se podia garantir que a assinatura isotópica dos peixes da piscicultura na altura é semelhante à atual. Foram

ainda recolhidos dentro da mesma piscicultura, mas num tanque que não recebia ração, três espécimes de *Solea senegalensis*. Estes indivíduos não foram recolhidos no estuário devido às dificuldades que a sua captura em águas livres e mais profundas implica. Obtiveram-se também três espécimes de *Sparus aurata* provenientes das águas do estuário (Figura 1). Os indivíduos criados na piscicultura foram adquiridos diretamente do piscicultor e aqueles que cresceram no estuário foram adquiridos a um pescador local. Todos os peixes foram de imediato congelados e armazenados até serem tratados. Posteriormente, retiraram-se vértebras e espinhas de todos os espécimes, as quais foram depois limpas utilizando pinças e água corrente.

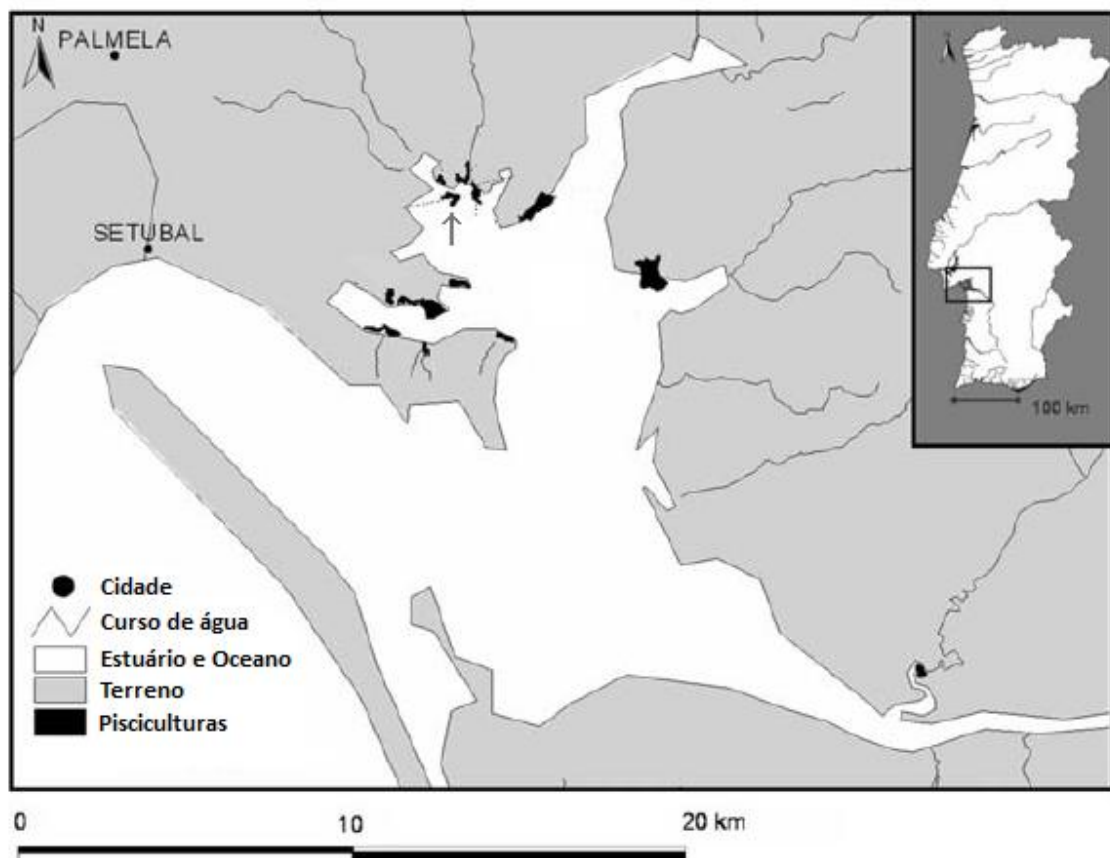


Figura 1 – Estuário do Sado: pisciculturas avaliadas por Freitas *et al.* em 2007 (polígono preto). Realce para a piscicultura Anjo (indicada pela seta)

### 2.3 Análise da composição isotópica de C e N em colagénio do osso dos peixes

Para avaliar a composição isotópica de carbono e azoto em colagénio do osso de peixes de interesse comercial com relevância neste estudo - *Sparus aurata* e *Solea spp.* – procedeu-se à determinação das composições isotópicas dos peixes capturados

tanto nas águas livres do estuário como na piscicultura antes e depois da extração dos lípidos, tendo como base o protocolo de Tykot 2004. As amostras foram colocadas em tubos de vidro e procedeu-se à remoção total do tecido muscular através de hidróxido de sódio 0.1M durante 24 horas. A seguir, foram lavadas com água ultra-pura e a desmineralização foi feita em ácido clorídrico a 2% durante 72 horas. De seguida foram novamente lavadas, três vezes, com água ultra-pura. Finalmente, procedeu-se à sua liofilização no Instituto de Oceanografia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Após a liofilização as amostras foram moídas e divididas em duas partes, e numa das partes procedeu-se à extração dos lípidos durante 24 horas através de uma solução de clorofórmio, metanol e água (1:2:0,8).

A partir do colagénio obtido foram determinadas as assinaturas isotópicas de carbono e azoto em todas as amostras, utilizando um espectrofotómetro de massas de razão isotópica *Isoprime* (MicroMan, R.U.), no *Stable Isotoper and Instrumental Analyzer Facility* – Centro de Biologia Ambiental – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Foram utilizados os materiais de referência IAEA-CH6 e IAEA-CH7 ou IAEA-600 para as determinações da razão isotópica do Carbono, ao passo que se utilizou os materiais de referência IAEA-N1 e IAEA-600 para as determinações da razão isotópica do Azoto. Os dados das razões isotópicas são apresentados em notação delta ( $\delta$ ) *standard* como partes *per mil*, com resultados relativos à *Pee Dee Belemnite* (PDB) para o  $\delta^{13}\text{C}$  e ao Ar atmosférico para o  $\delta^{15}\text{N}$ . Os valores de  $\delta$  são determinados de acordo com a seguinte equação:

$$\delta^{\text{H}}\text{X} (\text{‰}) = (R_{\text{Amostra}} / R_{\text{Standard}} - 1) \times 1000$$

onde  $X$  é o elemento,  $H$  é a massa do isótopo pesado,  $R$  é a razão entre o isótopo pesado e o isótopo leve do elemento  $X$ . A precisão das análises, calculada a partir da análise de 6 a 9 réplicas de padrões de laboratório (Metionina OAS e L-Cistina OAS, Elemental Microanalysis, Reino Unido), intercaladas em cada conjunto de análises, foi igual ou inferior a 0.2‰.

De seguida, as análises das composições isotópicas estenderam-se a cada conjunto de ossos de peixes presentes nos dejetos identificados como pertencentes a

cada um dos grupos produzidos na piscicultura (*Sparus aurata* e *Solea sp.*), seguindo o procedimento anteriormente descrito incluindo a extração de lípidos.

As razões  $C:N$  foram medidas em simultâneo com as análises das composições isotópicas, a partir das percentagens de cada elemento.

## 2.4 Avaliação da eficácia das equações de normalização

Primeiramente estudaram-se as diferenças entre os valores de  $\delta^{13}C$  antes e após a extração dos lípidos recorrendo a testes  $t$ . A análise foi realizada no programa STATISTICA v.10. Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade de variâncias foram avaliados através dos testes de *Kolmogorov–Smirnov* e de *Levene*, respetivamente.

De seguida, três modelos de normalização dos lípidos foram avaliados através da comparação das suas previsões com os resultados observados em amostras após a extração dos lípidos. As primeiras equações de normalização publicadas foram propostas por *McConnaughey e McRoy* 1979 e têm em conta o conteúdo lipídico, a razão  $C:N$  e a diferença no valor de  $\delta^{13}C$  entre proteínas e lípidos:

$$L = 93 \times (1 + (0,246 \times C:N - 0,775)^{-1})^{-1}$$

$$\delta^{13}C' = \delta^{13}C + D \left( 1 + (3,90 \times (1 + 287 \times L^{-1})^{-1}) \right)$$

$L$  é a proporção de lípidos na amostra,  $C$  e  $N$  são as proporções de carbono e azoto na amostra, respetivamente,  $\delta^{13}C'$  é o valor da composição isotópica de carbono normalizado,  $\delta^{13}C$  é o valor da composição isotópica de carbono medido,  $D$  é a diferença na composição isotópica de carbono entre proteínas e lípidos (6‰) e  $I$  é uma constante de valor -0,207. Mais recentemente, *Kiljunen et al.* 2006 reviram os parâmetros  $D$  e  $I$  para peixes marinhos e dulçaquícolas, atribuindo-lhes os seguintes valores  $D = 7.018$  e  $I = 0.048$ . Posteriormente, *Post et al.* 2007 identificou, entre outras, uma relação linear entre  $C:N$  e  $\Delta\delta^{13}C$ :

$$\Delta\delta^{13}C = -3.32 + 0,99 \times C:N$$

Assim, e após a determinação das composições antes e depois da extração dos lípidos nas seis amostras de cada espécie aplicaram-se as equações de normalização mencionadas. A eficiência de cada modelo ( $EF$ ) para cada uma das espécies foi determinada segundo a seguinte equação (Abrantes *et al.* 2011):

$$EF = 1 - \left[ \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \times \left( \sum (y_i - \bar{y}_i)^2 \right)^{-1} \right]$$

onde  $y_i$  é o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  observado após a extração de lípidos,  $\hat{y}_i$  é o valor esperado considerando cada uma das equações de normalização,  $\bar{y}_i$  é o valor médio das  $\delta^{13}\text{C}$  observadas após a extração dos lípidos. Se os valores observados e os valores previstos por determinado modelo coincidirem, então  $EF$  toma o valor 1 para esse modelo. Valores próximos de 0 ou negativos indicam que o modelo é não é eficaz. A  $EF$  dá uma ideia do ajuste do gráfico com os valores observados e previstos para  $\delta^{13}\text{C}$  à reta  $y = x$ .

## 2.5 Comparação das composições isotópicas de C e N no colagénio do osso em peixes de estuário e de piscicultura

Considerando os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  antes da extração dos lípidos e os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  após a mesma foram definidas as assinaturas isotópicas do colagénio do osso dos peixes de estuário e dos peixes da piscicultura recorreu-se a testes  $t$  para verificar se existiam diferenças significativas. A análise foi realizada no programa STATISTICA v.10. Os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade de variâncias foram avaliados através dos testes de *Kolmogorov–Smirnov* e de *Levene*, respetivamente.

## 2.6 Avaliação do consumo de douradas e linguados predados nas pisciculturas vs. predados no estuário

A apreciação do consumo das douradas e linguados de estuário e da piscicultura pela lontra foi feita com base com base nas composições isotópicas de C e N do colagénio do osso destas presas e através da avaliação da projeção gráfica destes pontos.



### 3. Resultados

#### 3.1 Avaliação da eficácia das equações de normalização

As razões  $C:N$  variaram entre 3,23 e 6,82‰ nas douradas e entre 3,08 e 5,85‰ nos linguados. Os seus valores médios são apresentados na (Tabela 1).

Verificou-se a existência de diferenças significativas entre os valores de  $\delta^{13}C$  determinados antes e após a extração dos lípidos tanto para as douradas ( $t = -9,49$ ,  $p < 0,05$ ), como para os linguados ( $t = -2,27$ ,  $p < 0,05$ ) capturados. Nas douradas os valores após a extração aumentaram em média cerca de 6‰ e nos linguados cerca de 3‰ (Tabela 1).

Quanto aos modelos de normalização dos lípidos considerados neste estudo, nenhum conseguiu fazer uma previsão eficaz dos valores de  $\delta^{13}C$  após a extração tanto para as douradas como para os linguados. Aplicando o modelo de eficiência (Abrantes *et al.* 2011), que compara os valores de  $\delta^{13}C$  observados após a extração dos lípidos com os valores previstos por cada um dos modelos, obtiveram-se valores negativos (Tabela 2) e, portanto, afastados do valor unitário (valores próximos de um são indicativos de que um modelo de normalização é eficaz). Todos os modelos em média sobrestimaram os valores de  $\delta^{13}C$  após a extração dos lípidos (Tabela 2 e Figura 2a, b). Em média o modelo de McConnaughey e McRoy 1979 foi o que mais se afastou dos valores observados em ambas as espécies (cerca de 6‰ nas douradas e 2,5‰ nos linguados) e o de Kiljunen *et al.* 2006 o que mais se aproximou.

Tabela 1 – Número de amostras ( $n$ ), razões médias  $C:N$  antes e após a extração dos lípidos ( $C:N$  e  $C:N_{ext}$ , respetivamente) e valores médios de  $\delta^{13}C$  antes e após a extração de lípidos e depois de corrigidos matematicamente segundo McConnaughey e McRoy, Kiljunen *et al.* e Post *et al.* ( $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{13}C_{ext}$ ,  $\delta^{13}C_{extMM}$ ,  $\delta^{13}C_{extK}$ ,  $\delta^{13}C_{extP}$ , respetivamente) para as amostras de *Sparus aurata* e *Solea spp.* consideradas

	$n$	$C:N$	$\delta^{13}C$	$\delta^{13}C_{ext}$	$\delta^{13}C_{corMM}$	$\delta^{13}C_{corK}$	$\delta^{13}C_{corP}$
<b>Dourada</b>	6	5,12	-19,13	-13,05	-18,34	-17,10	-17,38
<b>Linguado</b>	6	4,53	-16,60	-13,79	-16,25	-15,07	-15,44

Tabela 2 – Avaliação da eficiência (EF) de cada um dos modelos considerados – McConnaughey e McRoy, Kiljunen *et al.* e Post *et al.* – para douradas e linguados

	<b>McConnaughey &amp; McRoy 1979</b>	<b>Kiljunen <i>et al.</i> 2006</b>	<b>Post <i>et al.</i> 2007</b>
<b>EF</b> <b>Dourada</b>	-18,61	-10,67	-12,38
<b>EF</b> <b>Linguado</b>	-0,39	-0,33	-0,14

### 3.2 Dejetos

Do número total de dejetos armazenados na sequência do projecto FRAP, apenas foi possível utilizar sete (41,18%). Os restantes (n=10), após a triagem, não apresentavam as espécies com interesse comercial investigadas ou estas apareciam em quantidades que, após a moagem, se tornavam insuficientes para análise isotópica. Três destas amostras não possuíam qualquer estrutura esquelética sendo constituídos apenas por restos de lagostim (*Procambarus clarkii* Girard, 1852). De entre as sete amostras analisadas cinco continham douradas com um número mínimo de indivíduos variável – entre três e cinco – e três continham linguado com um número mínimo de um indivíduo por amostra (Tabela 3). Numa das sete amostras estavam presentes em simultâneo ambas as espécies mas a quantidade de linguado era tão pequena que não pôde ser analisada após a moagem.

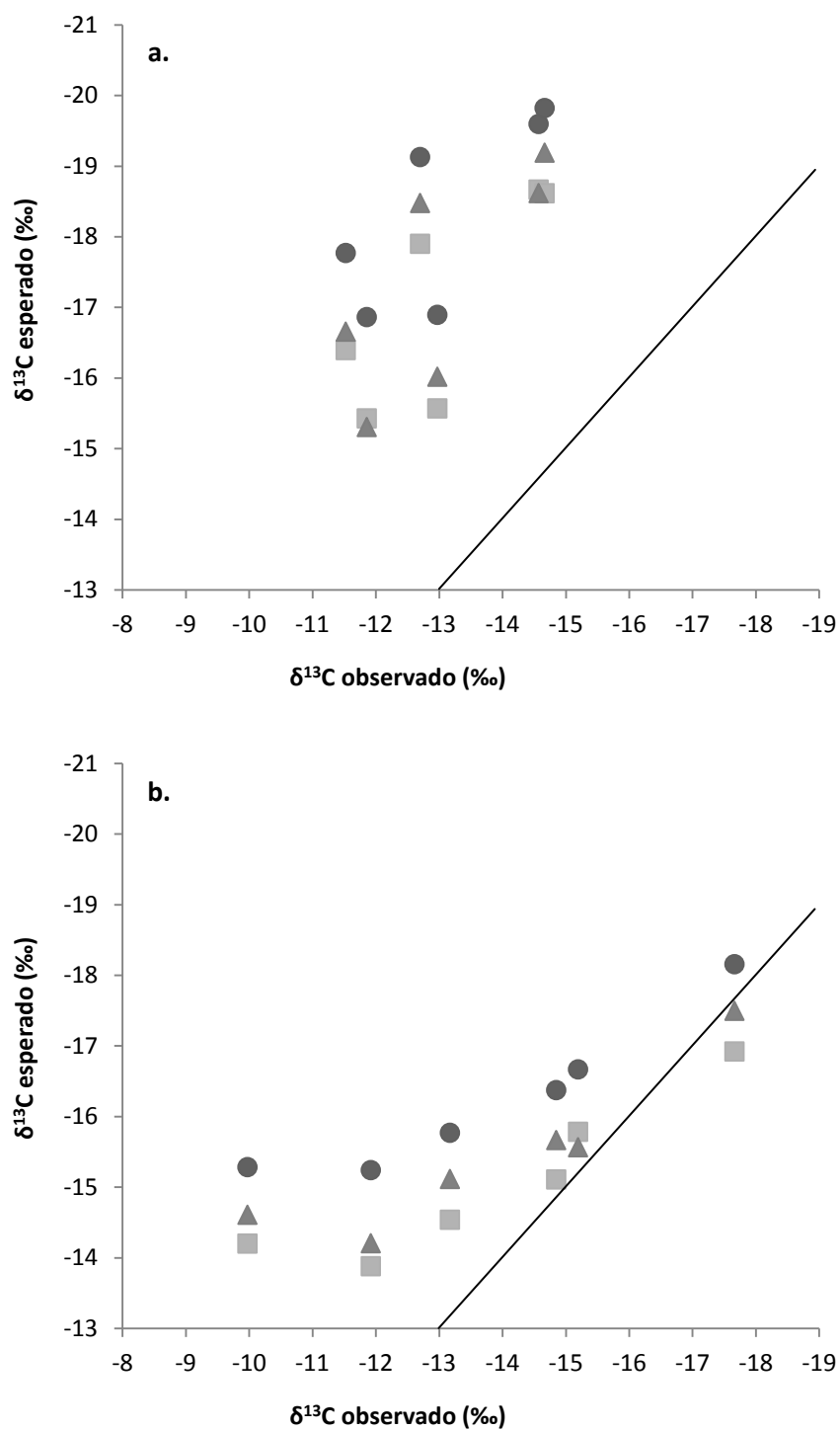


Figura 2 – Relações entre  $\delta^{13}\text{C}$  observado e  $\delta^{13}\text{C}$  esperado para as douradas (a.) e para os linguados (b.) com base nas equações de McConnaughey e McRoy (1979) (círculo), Kiljunen *et al.* (2006) (quadrado) e Post *et al.* (2007) (triângulo). A reta  $y = x$  está representada pela linha sólida

Tabela 3 – Número mínimo de peixes com interesse comercial por dejetos

Dejeto	Dourada	Linguado
1	5	1
2	3	0
3	0	1
4	0	1
5	3	0
6	4	0
7	3	0

### 3.3 Comparação das composições isotópicas de C e N no colagénio do osso em peixes de estuário e de piscicultura

Nos gráficos de distribuição bivariada  $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$  para douradas e linguados provenientes das águas livres de estuário e da piscicultura observam-se dois grupos distintos em ambas as espécies (**Figura 3**). As douradas alimentadas a ração possuem assinaturas significativamente menos enriquecidas em  $\delta^{13}\text{C}$  ( $t = -3,14$ ,  $p < 0,05$ ) e em  $\delta^{15}\text{N}$  ( $t = -10,39$ ,  $p < 0,05$ ) que as douradas provenientes de estuário. Os linguados da piscicultura mostraram assinaturas significativamente menos enriquecidas em  $\delta^{15}\text{N}$  ( $t = 4,27$ ,  $p < 0,05$ ) que os indivíduos da mesma espécie que cresceram num tanque sem ração. No entanto estes dois grupos não possuem valores de  $\delta^{13}\text{C}$  significativamente diferentes ( $t = 1,43$ ,  $p > 0,05$ ). A análise da **Tabela 3** e da **Figura 3** permite verificar que os linguados apresentam uma maior variabilidade nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que as douradas ou que os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  em qualquer uma das espécies. É também nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos linguados que se regista a única situação de sobreposição de valores, uma vez que o valor máximo de  $\delta^{13}\text{C}$  para os indivíduos que não comem ração é superior ao valor mínimo dos indivíduos desta espécie que recebem a ração.

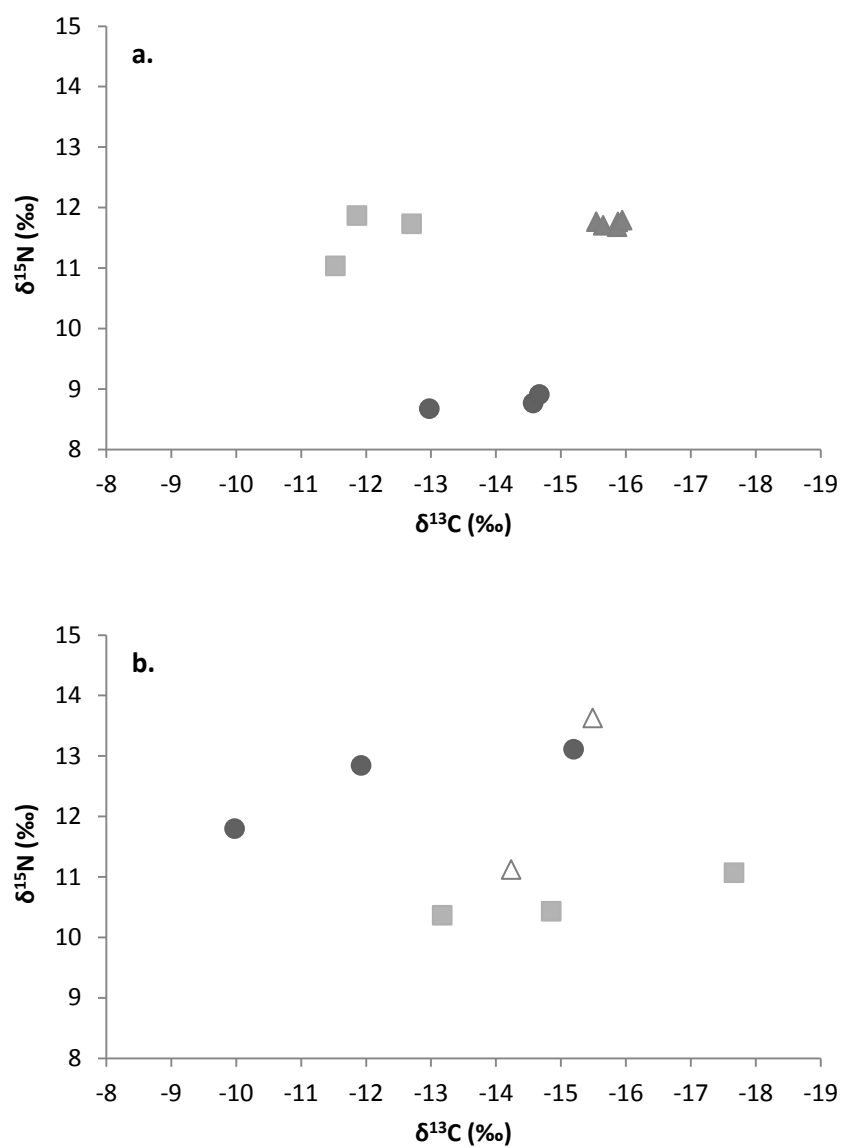


Figura 3 – Variação de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  em dourada (a.) e linguado (b.) alimentados a ração (círculo) e não alimentados a ração (quadrado) e nas peças esqueléticas encontradas nos dejetos (triângulo)

Tabela 4 - Assinaturas isotópicas médias (Med), desvio-padrão (DP), mínimo (Min) e máximo (Max) de *Sparus aurata* e *Solea spp.* provenientes das águas livres do estuário (Est) e da piscicultura (Pis)

		$\delta^{13}\text{C}$				$\delta^{15}\text{N}$			
		Med	DP	Min	Max	Med	DP	Min	Max
<b><i>Dourada</i></b>	<b>Est</b>	-12,03	0,61	-12,70	-11,52	11,55	0,45	11,04	11,87
	<b>Pis</b>	-14,07	0,95	-14,66	-12,97	8,78	0,12	8,67	8,91
<b><i>Linguado</i></b>	<b>Est</b>	-15,23	2,27	-17,66	-13,17	10,62	0,39	10,36	11,07
	<b>Pis</b>	-12,36	2,64	-15,19	-9,97	12,58	0,69	11,80	13,11

#### 3.4 Avaliação do consumo de douradas e linguados predados nas pisciculturas vs. predados no estuário

As peças esqueléticas de dourada encontradas nos dejetos de lontra apresentaram assinaturas isotópicas de C e N distintas tanto das assinaturas determinadas para as douradas de estuário como da piscicultura. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  são semelhantes aos das douradas pescadas no estuário mas os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  bastante inferiores aos destas últimas e inferiores, ainda, aos das douradas da piscicultura.

Quanto aos linguados encontrados nos dejetos consegue-se perceber que uma das assinaturas isotópicas determinadas se encontra dentro dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  esperados para os linguados que se alimentam da ração e outra dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  esperados para linguados consumidores de alimento natural.

## 4. Discussão

### 4.1 Comparação das composições isotópicas de C e N no colagénio do osso em peixes de estuário e de piscicultura

Este estudo permitiu verificar que é possível distinguir douradas provenientes da piscicultura e das águas livres do estuário com base nas composições isotópicas de C e N do colagénio do osso. Esta separação deve-se muito provavelmente ao fato de estes grupos terem dietas diferentes (Ben-David *et al.* 2004; Tykot 2004; Schroder & Leaniz 2011). Os indivíduos criados na piscicultura são significativamente menos enriquecidos em  $^{13}\text{C}$  e em  $^{15}\text{N}$  que os que habitam no estuário. Apesar de a existência de diferenças ser expectável, esperava-se que as douradas provenientes da piscicultura tivessem valores de  $\delta^{15}\text{N}$  superiores aos indivíduos da mesma espécie que cresceram no estuário (Schroder & Leaniz 2011), uma vez que na piscicultura os animais têm acesso a uma fonte de alimento muito enriquecida. No entanto, elevados níveis de azoto nas águas poderão levar a um aumento artificial dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  nos peixes selvagens que aí habitam (Anderson & Cabana 2005). Uma vez que, no Estuário do Sado, se encontram várias plantações de arroz, são de esperar impactos vindos desta atividade que utiliza fertilizantes de nitratos nas águas do estuário para onde estes produtos acabam por ser escoados. Esta situação poderá ter conduzido a que as douradas do estuário sejam mais enriquecidas em  $^{15}\text{N}$  que as douradas da piscicultura.

Quanto aos linguados foi também possível notar diferenças significativas entre as composições isotópicas de azoto da piscicultura e do estuário. Mas, ao contrário do que acontece com as douradas, nesta espécie os indivíduos criados na piscicultura são os mais enriquecidos em  $^{15}\text{N}$ . Uma vez que estes animais se deslocam junto ao fundo, poderão consumir fontes de azoto menos enriquecidas, e ser menos afetados pelos nitratos provenientes da agricultura. A composição isotópica de C do colagénio dos ossos dos linguados não permitiu fazer a distinção entre os animais da piscicultura e de estuário. Tal, pode dever-se ao fato de os poliquetas presentes na vasa constituírem, para além da ração, uma parte importante da dieta dos linguados criados nos tanques. Esta situação aproximaria a sua dieta da dos linguados do estuário e traduzir-se-ia

numa mais difícil distinção entre ambos através da análise das composições isotópicas. Além disso, poderia também explicar o porquê da grande variabilidade dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  verificada para os linguados dentro da piscicultura, uma vez que alimentando-se de presas naturais, para além da ração, estes animais aumentariam a variabilidade da sua dieta e consequentemente dos valores das composições isotópicas de C.

Ainda assim, os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  são, por si só, suficientes para fazer a distinção pretendida.

#### 4.2 Avaliação do consumo de douradas e linguados predados na piscicultura vs. predados no estuário

As peças esqueléticas de dourada, encontradas nos dejetos de lontra considerados, possuem uma composição isotópica do colagénio do osso para C distinta tanto dos indivíduos da mesma espécie que habitam o estuário como dos da piscicultura. Já as assinaturas isotópicas de N são semelhantes às das douradas do estuário, mas muito diferentes das douradas da piscicultura. Tendo em conta que a ração que alimenta os peixes da piscicultura atualmente é a mesma que era utilizada na altura da recolha das amostras exclui-se a possibilidade de as peças esqueléticas pertencerem a douradas provenientes deste local. Entretanto, é expectável que exista um gradiente nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que aumenta da periferia para o interior do estuário (Matson & Brinson 1990). Este aumento dever-se-à à presença de plantas C4 nas zonas onde as águas são mais profundas e da existência de algumas plantas C3 junto às margens (C. Máguas com. pess.). Assim sendo, as douradas pescadas pelo pescador em zonas mais afastadas da margem teriam valores de  $\delta^{13}\text{C}$  menos negativos enquanto as caçadas pelas lontras, que preferencialmente procuram as presas em águas pouco profundas, teriam valores mais negativos devido à influência das plantas C3 aí presentes. Se a isto juntarmos o fato de as assinaturas de  $\delta^{15}\text{N}$  das douradas presentes nos dejetos serem semelhantes às encontradas nas douradas pescadas, podemos inferir que a lontra terá caçado estes animais ao estuário. Outra hipótese que poderá explicar estes resultados é as peças esqueléticas presentes nos dejetos pertencerem a douradas caçadas numa piscicultura vizinha daquela em que a recolha das amostras ocorreu, onde a ração usada para as alimentares pudesse dar origem à assinatura isotópica obtida. No entanto, esta hipótese parece menos provável uma vez que não



parece razoável as lontras marcarem a piscicultura selecionada se não se alimentam aí frequentemente.

A localização da piscicultura mais longe das linhas de água que as águas livres do estuário, corrobora também a ideia de que as douradas encontradas nos dejetos provêm do estuário, uma vez que as lontras necessitam deste corpos de água doce para lavarem a sua pelagem espessa após saírem das águas mais salobras do estuário com o objetivo de manter o seu potencial termorregulador (Kruuk & Balharry 1990).

O carácter preliminar deste estudo, cujo principal objectivo era testar a aplicabilidade da análise isotópica no esclarecimento da origem das presas consumidas, e, consequentemente, o reduzido número de amostras em análise traduz-se numa resposta insuficiente para que se possam ter algumas certezas quanto às inferências feitas. Ainda assim, são indicativos de que as douradas da piscicultura Anjo não estavam a ser caçadas pela lontra na altura da recolha dos dejetos.

No caso dos linguados as duas amostras analisadas correspondiam, cada uma, a um dos grupos formados a partir das assinaturas isotópicas do azoto que separavam os linguados alimentados com ração dos linguados sem ração. Uma vez que na altura da recolha dos dejetos todos os tanques estavam a receber ração, as peças esqueléticas encontradas com assinaturas em N semelhantes às dos linguados que não comem ração devem ser atribuídas a animais provenientes do estuário. Assim, a análise da **Figura 3b**, infere-se que as peças esqueléticas de um dos dejetos pertenciam a um animal de estuário e as outras a um animal da piscicultura. Isto poderá dar a ideia que as lontras se alimentam de linguados tanto no estuário como na piscicultura. No entanto, considerando que 1) estes animais se escondem e movimentam junto ao substrato e utilizam o mimetismo para escapar aos predadores e 2) que ao mesmo tempo este fato faz com que entre douradas e linguados presentes nos tanques as primeiras sejam mais fáceis de capturar, e considerando ainda que 3) as lontras não parecem ter-se alimentado das douradas da piscicultura, é possível que a provável captura de um linguado na piscicultura seja esporádica.

Assim, se percebe que apesar de o piscicultor ter uma percepção de conflito elevada esta não corresponde diretamente a um elevado consumo dos peixes que produz.

A análise de dejetos e peixes de outras pisciculturas poderá ajudar a esclarecer algumas das hipóteses levantadas. A recolha e subsequente análise de dejetos atuais poderá ajudar a perceber se os locais de caça da lontra se mantiveram inalterados ou se houve alguma modificação significativa.

#### 4.3 Avaliação da eficácia das equações de normalização

Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do colagénio do osso das douradas e linguados determinados após o processo de extração dos lípidos são significativamente mais elevados que os valores encontrados antes do mesmo processo. Este fato vem confirmar estudos anteriores (Roth 2002, Sweeting *et al.* 2006, Fox-Dobbs *et al.* 2007) que apontavam a necessidade de ter em conta os efeitos deste componente bioquímico aquando da determinação de assinaturas isotópicas de carbono.

A extração dos lípidos é um processo simples, mas que implica tempo e custos adicionais. Vários autores tentaram encontrar modelos que permitissem corrigir matematicamente os seus efeitos (McConnaughey e McRoy 1979, Kiljunen *et al.* 2006 e Post *et al.* 2007), na tentativa de evitar as desvantagens que o processo de extração comporta. Neste estudo testaram-se três destes modelos – McConnaughey e McRoy 1979, Kiljunen *et al.* 2006 e Post *et al.* 2007 – em todos os peixes capturados, para que se pudesse evitar a extração dos lípidos nas restantes amostras, caso pelo menos um deles se mostrasse eficaz (Abrantes *et al.* 2011).

O modelo de normalização dos lípidos de McConnaughey e McRoy 1979 mostrou-se ineficaz para as douradas e os linguados. Isto poderá decorrer do fato de os dados em que estes autores se basearam para desenvolver o modelo terem sido recolhidos em organismos do Mar de Beringue, um ambiente em tudo diferente do Estuário do Sado. Além disso, no caso dos linguados a diferença entre os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  antes e após da extração dos lípidos é de cerca de 3‰, o que não está de acordo com a constante  $D$  usada no modelo que corresponde a uma diferença nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre lípidos e proteínas de 6‰.

Kiljunen *et al.* (2006) modificaram o modelo anterior e reviram o valor de  $D$  para 7.018‰. O novo modelo de normalização proposto por estes autores também não se ajusta aos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  obtidos após a extração dos lípidos. Mais uma vez o fato de o valor de  $D$  se afastar da diferença os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  antes e após da extração

dos lípidos em douradas (6‰) e linguados poderá estar a contribuir para este resultado.

O fato de os dois modelos considerados anteriormente se basearem numa diferença constante entre proteínas e lípidos poderá ser desvantajoso, uma vez que vários estudos comprovaram já que esta diferença varia entre taxa (Logan *et al.* 2008 e Oppel *et al.* 2010).

A fórmula proposta por Post *et al.* 2007 não assenta nesta diferença e sim apenas na razão  $C:N$ . No entanto, também esta se revelou ineficaz. As razões  $C:N$  que contribuíram para a obtenção da fórmula proposta por estes autores variam entre cerca de 3 e 7. No estudo feito no Estuário do Sado os valores variaram entre cerca de 3 e 6 tanto nas douradas como nos linguados. Assim, a razão desta ineficácia poderá simplesmente ter a ver com as espécies em causa, pois o estudo destes autores, apesar de contemplar vários peixes, não abrange as duas espécies aqui investigadas.

Assim, sempre que se pretenda utilizar um modelo de normalização dos lípidos para poupar tempo e dinheiro na determinação de assinaturas isotópicas de carbono, é aconselhável testá-lo num pequeno número de amostras para verificar a sua eficácia. O ignorar deste passo poderá levar a aceitar como verdadeiros valores consideravelmente distintos dos valores reais, condicionando desta forma as interpretações dos resultados e falseando conclusões.

#### 4.4 Dejetos

De entre as amostras triadas, menos de metade continha partes esqueléticas de douradas e/ou linguados. A maioria, portanto, não registava a presença das espécies com interesse comercial investigadas, sendo que três continham apenas lagostim, uma espécie ausente na piscicultura. Apesar de o número de amostras ser pequeno, é possível verificar que apesar de as lontras marcarem o território no perímetro dos tanques com frequência, estas nem sempre se alimentam das espécies aí exploradas.

#### 4.5 Considerações finais

Aparentemente, não parece haver motivo para a elevada aversão pela lontra verificada na piscicultura analisada. Mesmo quando estes animais marcam o território

no perímetro dos tanques, os dados sugerem que se alimentam de peixe proveniente do estuário.

Um estudo mais abrangente, quer em tempo quer em número de dejetos, será necessário para obter resultados mais robustos.

A confirmarem-se as hipóteses aqui apresentadas, o passo seguinte deverá ser comunicar aos piscicultores, numa tentativa de conseguir diminuir a pressão humana exercida sobre este carnívoro.

Diferenças na predação exercida pela lontra nas diferentes pisciculturas relacionadas com 1) a distância destas a linhas de água doce, 2) o comportamento dos piscicultores, 3) as medidas de restrição que usam ou 4) as espécies produzidas nos tanques, entre outras, poderão também ser analisadas futuramente. O esclarecimento destes pontos deverá ajudar a compreender melhor o comportamento das lontras nesta área de pisciculturas.

## 5. Bibliografia

Abrantes KG, Semmens JM, Lyle JM, Nichols PD (2011) Normalisation models for accounting for fat content in stable isotope measurements in salmonid muscle tissue. Marine Biology DOI: 10.1007/s00227-011-1789-1

Anderson C, Cabana G (2005)  $\delta^{15}\text{N}$  in riverine food webs: effects of N inputs from agricultural watersheds. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62: 333-340

Bartz, KK, Naiman RJ (2005) Effects of salmon-borne nutrients on riparian soils and vegetation in southwest Alaska. Ecosystems 8: 529–545

Ben-David M, Titus K, Beier LR (2004) Consumption of salmon by Alaskan brown bears: a trade-off between nutritional requirements and the risk of infanticide? Oecologia 138: 465–474

Brenna JT, Corso TN, Tobias HJ, Caimi RJ, (1997) High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 16: 227–258

Cabral HN (2000) Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. Journal of Fish Biology 57: 1550-1562

Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queiroz AL, Rogado L, Santos-Reis M (2005) Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa

Cerling TE, Wittemyer G, Rasmussen HB, Vollrath F, Cerling CE, Robinson TJ, Douglas-Hamilton I (2006) Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 103: 371-373

Codron D, Lee-Thorp JA, Sponheimer M, Ruiters D, Codron J (2006) Inter- and Intra-habitat Dietary Variability of Chacma Baboons (*Papio ursinus*) in South African

Savannas Based on Fecal  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and %N. American Journal Of Physical Anthropology 129:204–214

Crawford K, McDonald RA, Bearhop S (2008) Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals. Mammal Reviews 38: 87–107

Cryan PM, Bogan MA, Rye RO, Landis GP, Kester CL (2004) Stable hydrogen isotope analysis of bat hair as evidence for seasonal molt and long-distance migration. Journal of Mammalogy 85: 995–1001

Dempson JB, Power M (2004) Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. Ecology of Freshwater Fish 13: 176-184

Dupras TL, Schwarcz HP, Fairgrieve SI, (2001) Infant feeding and weaning practices in Roman Egypt. American Journal of Physical Anthropology 115: 204 –211

Ehleringer JR (1991)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation and its utility in terrestrial plant studies. In: Coleman DC, Fry B (eds) Carbon Isotope Techniques. Academic Press, New York , pp 187–200

Fox-Dobbs K, Bump JK, Peterson RO, Fox DL, Koch PL (2007) Carnivore-specific stable isotope variables and variation in the foraging ecology of modern and ancient wolf populations: case studies from Isle Royale, Minnesota, and La Brea. Canadian Journal of Zoology 85: 458-471

Freitas D, Gomes J, Sales-Luís T, Madruga L, Marques C, Baptista G, Rosalino LM, Antunes P, Santos R, Santos-Reis M (2007) Otters and fish farms in the Sado estuary: ecological and socio-economic basis of a conflict. Hydrobiologia 587: 51–62

Fry B (2006) Stable Isotope Ecology. Springer Science e Business Media, New York

Hobson KA, McFarland KP, Wassenaar LI, Rimmer CC, Goetz JE (2001) Linking breeding and wintering grounds of bicknell's thrushes using stable isotope analyses of feathers. The Auk 118: 16–23

- Kiljunen M, Grey J, Sinisalo T, Harrod C, Immonen H, Jones RI (2006) A revised model for lipid-normalizing  $^{13}\text{C}$  values from aquatic organisms, with implications for isotope mixing models. *Journal of Applied Ecology* 43: 1213–1222
- Kruuk H, Balharry D (1990) Effects of sea water on thermal insulation of the otter, *Lutra lutra*. *Journal of Zoology* 220: 405–415
- Lajtha K, Michener RH (1994) *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, 2<sup>nd</sup>ed. Blackwell Scientific, London
- Loader NJ, Robertson I, McCarroll D (2003) Comparison of stable carbon isotope ratios in the whole wood, cellulose and lignin of oak tree-rings. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196: 395–407
- Logan JM, Jardine TD, Miller TJ, Bunn SE, Cunjak RA, Lutcavage ME (2008) Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modelling methods. *Journal of Animal Ecology* 77: 838–846
- Matson EA, Brinson MM (1990) Stable carbon isotopes and the C:N ratio in the estuaries of the Pamlico and Neuse Rivers, North Carolina. *Limnology and Oceanography* 35: 1290–1300
- McConnaughey T, McRoy CP (1979) Food-Web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Marine Biology* 53: 257–262
- McKechie AE (2004) Stable isotopes: powerful new tools for animal ecologists. *South African Journal of Science* 100: 131–134
- Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relationship between  $^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 1135–1140
- Morrison SS, Vogel P (2009) Aquaculture ponds, a Jamaican study: The impact of birds on fish production. *African Journal of Agricultural Research* 4: 1447–1454

Newsome SD, Koch PL, Etnier MA, Aurióles-Gambao D (2006) Using carbon and nitrogen isotope values to investigate maternal strategies in northeast Pacific otariids. *Marine Mammal Science* 22: 556–572

Oppel S, Federer RN, O'Brien DM, Powell AN, Hollmén TE (2010) Effects of Lipid Extraction on Stable Isotope Ratios in Avian Egg Yolk: Is Arithmetic Correction a Reliable Alternative? *The Auk* 127: 72–78

Patterson BD, Kasiki SM, Selempo E, Kays RW (2004) Livestock predation by lions (*Panthera leo*) and other carnivores on ranches neighboring Tsavo National Parks, Kenya. *Biological Conservation* 119: 507–516

Pita C, Gamito S, Erzini K (2002) Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondylusoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). *Journal of Applied Ichthyology* 18: 81-86

Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703–718

Post DM, Layman CA, Arrington DA, Takimoto G, Quattrochi J, Montana CG (2007) Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152: 179–189

Roth JD (2002) Temporal variability in arctic fox diet as reflected in stable-carbon isotopes; the importance of sea ice. *Oecologia* 133: 70–77

Ruiz-Olmo J, Loy A, Cianfrani C, Yoxon P, Yoxon G, de Silva PK, Roos A, Bisther M, Hajkova P, Zemanova B (2008) *Lutra lutra*. IUCN Red List of Threatened Species Versão 2011.1

Schroder V, Leaniz CG (2011) Discrimination between farmed and free-living invasive salmonids in Chilean Patagonia using stable isotope analysis. *Biological Invasions* 13: 203–213



Sweeting CJ, Polunin NVC, Jennings S, (2006) Effects of chemical lipid extraction and arithmetic lipid correction on stable isotope ratios of fish tissues. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 595–601

Trindade A (1991) Fish farming and otters in Portugal. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin* 6: 7–9

Trindade A, Farinha N, Florêncio E, Sousa M (1995). Otter conservation in Portugal: distribution and status of *Lutra lutra* in five protected areas of the country. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin* 12: 15–24.

Tykot RH (2004) Stable isotopes and diet: You are what you eat. In: Course CLIV, Martini M, Milazzo M, Piacentini M (eds) *Proceedings of the International School of Physics “Enrico Fermi”*. IOS Press, Amsterdam pp 433-444

Tykot RH (2006) Isotope Analyses and the Histories of Maize In: Staller JE, Tykot RH, Benz BF (eds) *Histories of Maize*. Elsevier, Estados Unidos da America, pp 131-142

West JB, Bowen GJ, Cerling TE, Ehleringer JR (2006) Stable isotopes as one of nature’s ecological recorders. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 408-414

Yeo JH, Neo H (2010) Monkey business: human–animal conflicts in urban Singapore *Social & Cultural Geography*, *Social & Cultural Geography*, 11: 681 — 699

Zhang L, Wang N (2003) An initial study on habitat conservation of Asian elephant (*Elephas maximus*), with a focus on human elephant conflict in Simao, China. *Biological Conservation* 112: 453-459

#### Websites:

CARNIVORA - Núcleo de estudo de carnívoros e seus ecossistemas  
<http://carnivora.fc.ul.pt/> (Acedido a 2011.06.15)

ICNB – Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade  
<http://portal.icnb.pt/ICNPortal/vPT2007/> (Acedido a 2011.06.15)

WWF International (2006) Species fact sheet: Human-animal conflict  
<http://www.wwf.org/> (Acedido a 2011.09.1)